

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Sun-Young Kim, et al.

Serial No. 09/029,042

Filed: May 15, 1998

For: Heterologous Protein Production System
Using Avian Cells

Examiner: Deberry, R.

Art Unit 1647



1600/2900

#30
P.J.
2/27/02

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicants respectfully request a convention priority for the above-captioned application, namely Korean application number 1995-0026391, filed August 24, 1995. A certified copy of the document as well as an English translation is submitted herewith.

Respectfully submitted,

BLAKELY, SOKOLOFF, TAYLOR & ZAFMAN LLP

Date: 2/4/02

William T. Babbitt
William Thomas Babbitt, Reg. No. 39,591

12400 Wilshire Boulevard
Seventh Floor
Los Angeles, CA 90025
(310) 207-3800

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on February 4, 2002.

Nedy Calderon
Nedy Calderon

2/4/02
Date

RECEIVED
FEB 25 2002
TECH CENTER 1600/2900





대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 :
Application Number

특허출원 1995년 제 26391 호
PATENT-1995-0026391

출원 년 월 일 :
Date of Application

1995년 08월 24일
AUG 24, 1995

출원 인 :
Applicant(s)

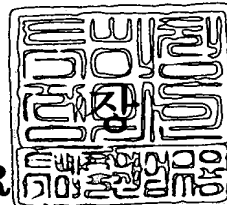
일동제약주식회사
IL DONG PHARM CO., LTD.



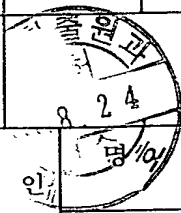
2001 년 12 월 18 일

특 허 청

COMMISSIONER



부
본
공고공보송

IPC 분류 기호	주분류			방식 심사 기관	출원번호 : 26391																				
	부분류				담당	심사관																			
접수 인란			특 허 출 원 서 (심 사 청 구)																						
출원인	명칭	일동제약 주식회사 대표이사 윤원영	출원인 코드	14513840	국적	대한민국																			
	주소	서울특별시 서초구 양재동 60 @ 137-130																							
대리인	성명	김원호 김재만	대리인코드	389-A 137 610-A 386																					
	주소	서울특별시 강남구 역삼동 825-33	전화번호	553-5990																					
발명자	성명	김선영	주민등록번호	551103-1074314	국적	대한민국																			
	주소	서울특별시 성동구 금호3가동 두산아파트 109동 1304호																							
발명의명칭		오리 배 세포를 이용한 에리스로포이틴의 발현 시스템																							
특허법 (제54조 또는 제55조)의 규정에 의한 우선권 주장		출원 국명	출원의 종류	출원 일자	출원 번호	증명서류 첨부 미첨부																			
특허법 제 42조의 규정에 의하여 위와같이 출원합니다. 1995년 8월 24일 대리인 김원호 김재만 특허청장 귀하																									
특허법 제 60조의 규정에 의하여 위와같이 출원심사를 청구합니다. 대리인 김원호 김재만 특허청장 귀하																									
구비서류 : 1. 출원서 부분 2통 2. 명세서, 요약서 및 도면 각 3통 3. 위임장 1통				<table border="1"> <tr> <td colspan="4">수수료</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">출원료</td> <td>기본료</td> <td>20 면</td> <td>₩ 20,000</td> </tr> <tr> <td>가산료</td> <td>32 면</td> <td>₩ 22,400</td> </tr> <tr> <td colspan="2">심사청구료</td> <td>20 항</td> <td>₩ 398,000</td> </tr> <tr> <td colspan="2">합계</td> <td colspan="2">₩ 440,400</td> </tr> </table>			수수료				출원료	기본료	20 면	₩ 20,000	가산료	32 면	₩ 22,400	심사청구료		20 항	₩ 398,000	합계		₩ 440,400	
수수료																									
출원료	기본료	20 면	₩ 20,000																						
	가산료	32 면	₩ 22,400																						
심사청구료		20 항	₩ 398,000																						
합계		₩ 440,400																							

YOU ME

特許法律事務所
PATENT & LAW FIRM

명세서

1. 발명의 명칭

오리 배 세포를 이용한 에리트로포이틴의 발현 시스템

2. 도면의 간단한 설명

제1도는 조류 세포에서 박테리아 CAT 유전자의 발현을 나타내는 사진이다. 이 때 오리 배 세포((duck embryo cell, 이하 "DE"라 함) 및 닭 배 섬유아 세포(chicken embryo fibroblast cell, 이하 "CEF"라 함)는 CAT 서열을 포함 (+) 또는 포함하지 않는 (-) 발현 벡터로 트랜스펙션시켰다. 이 플라스미드에서 CAT 유전자의 발현은 HCMV(human cytomegalovirus) MIEP(major immediate-early promoter)에 의하여 유도된다. CAT 활성은 ^{14}C -클로람페니콜 (C)로부터 생산되는 아세틸화된 클로람페니콜 (AC)의 양을 결정하여 측정하였다. 표기된 수치는 5회 이상의 실험중 대표적인 것으로 나타내었다. 제1도에 나타난 결과를 얻기 위해서는 10 μg 의 단백질을 ^{14}C -클로람페니콜과 함께 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분간 배양하였다.

제2도는 여러 종류의 세포들 및 프로모터들 사이에 CAT 유전자 발현을 비교하여 나타내는 사진이다. 세개의 프로모터-CAT 융합 구조체를 DE, CEF, CHO-K1, HeLa 세포에 트랜스펙션시키고 CAT 활성을 제1도에서처럼 측정하였다. S : SV40 early promoter; C : HCMV MIEP; R : RSV LTR; 표기된 수치는 5회 이상의 실험중 대표적인 것으로 나타내었다. 제2도에 나타낸 결과를 얻기 위해서는 10 μ g의 단백질을 14 C-클로람페니콜과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양하였다.

제3도는 다양한 세포에서 DNA 트랜스펙션의 효율을 나타내는 그래프이다. pCMV-lacZ 구조체를 DE, CHO, Vero, HeLa, 293T 세포에 제2도의 실험에서 사용한 조건을 사용하여 칼슘 포스페이트-DNA 공침전시켜 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션하고 2 내지 3일후 세포를 X-gal로 고정하고 염색하였다. 60 mm 배양 플레이트당 청색 세포의 수를 세었다. 플레이트상에 세포의 총수는 $1-3 \times 10^5$ 정도로 유사하였다. 트랜스펙션 효율은 DE 세포를 기준으로 상대적으로 계산한 것이다.

제4도는 인체 EPO의 클로닝 및 발현 벡터의 구조에 대한 개략적인 다이어그램이다. 다섯개의 블록은 EPO의 다섯개 코딩 부위이다. 첫번째 PCR은 프라이머 25 및 33을 사용하여 실시하였다. 증폭된 DNA 절편을

클로닝하여 프라이머 12 및 9를 사용하여 두번째 PCR을 실시하였다.

프라이머 12에서 굴곡선 (wavy tale)은 제일 코딩 부위로부터 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 그러므로 두번째 PCR후에는 EPO 전체 코딩 부위가 만들어졌다. 프라이머 12 및 9는 5' 말단후에 Hind III 링커를 포함한다. 이와 같이 증폭되어 클로닝된 EPO DNA는 여러가지 형태의 발현 벡터에서 클로닝되었다.

제5A도부터 제5C도는 본 발명의 일 실시예로서 클로닝되어 사용된 인간 HE-EPO 게놈 DNA의 염기 서열 및 아미노산 서열이다.

제6A도부터 제6C도는 본 발명의 일 실시예로서 클로닝되어 사용된 인간 SHE-EPO 게놈 DNA의 염기 서열 및 아미노산 서열이다.

제7A도부터 제7F도는 본 발명에서 클로닝된 SH-EPO와 HE-EPO 게놈 유전자의 염기서열을 이미 보고된 2개의 EPO 게놈 유전자인 AM-EPO, GI-EPO 게놈 유전자와 비교하여 나타낸 염기서열이다. AM-EPO를 기준으로 하여 다른 염기는 상자로 표시하였다.

제8도는 본 발명에 따라 클로닝된 SH-EPO와 HE-EPO 단백질의 아미노산 서열을 이미 보고된 2개의 EPO인 AM-EPO, GI-EPO와 비교하여

나타낸 아미노산 서열이다. 다른 아미노산은 상자로 표시하였다.

제9도는 오리 배 세포에서 생산된 EPO를 ELISA 방법과 *in vitro* 바이오어세이(bioassay)에 의하여 측정한 결과를 서로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

제5도부터 제8도의 상기한 아미노산 서열에서 단문자 표기의 아미노산은 다음과 같다.

A : alanine R: arginine N: asparagine D: aspartic acid

C: cysteine Q: glutamine E: glutamic acid H: histidine

I: isoleucine L: leucine K: lysine M: methionine

F: phenylalanine P: proline S: serine T: threonine

W: tryptophan Y: tyrosine V: valine

3. 발명의 상세한 설명

[산업상 이용분야]

본 발명은 인간의 에리스로포이틴(erythropoietin, 이하 "EPO"라 함)를 비롯한 여러 가지 이종 단백질 (heterologous protein)의 발현 시스템 및 이를 이용한 이종 단백질의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 에리스로포이틴을 코딩하는 계놈과 각종 이종 단백질을 코딩하고 있는 DNA를 오리 배 세포에 삽입하여 에리스로포이틴 및 각종 이종 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[종래 기술]

의약품에 사용되는 많은 재조합 단백질들 중 그 구조가 비교적 작고 간단하면서 생물학적 활성을 갖는 단백질들은 대장균과 같은 원핵생물에서 생산될 수 있다. 그러나 의학적 유용성이 높은 인체 단백질들, 예를 들면, TPA(tissue plasminogen activator), Factor VIII, EPO 등은, 생물학적 활성을 나타내기 위해서 단백질 번역 후 수정(posttranslational modification)이라는 과정을 필요로 하기 때문에 이와 같은 과정을 수행하지 못하는

원핵생물에서는 그 생산이 어렵다고 알려져 있다. 예를 들면, EPO는 분자량의 40 %가 탄수화물로 글리코실화가 많이 되어 있는데, 이들 EPO의 탄수화물 부분은 EPO의 생물학적 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 단백질 번역 후 수정을 행하지 못하는 대장균 또는 수정 과정이 약간 다른 효모나 곤충 세포에서 생산된 EPO는 생체내에서 불활성을 나타내거나 또는 매우 미미한 활성만을 나타내지만, 단백질 번역후 수정을 하는 포유 동물 세포인 COS 또는 CHO 세포에서 생산된 EPO는 완전한 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 따라서 의약용으로 현재 생산되는 EPO를 포함한 몇몇 인체 단백질들은 이러한 포유류 동물 세포에서만 생산되어 왔다.

한편 상기한 포유류 세포에서의 유전자 발현 이외에 조류에서의 유전자 발현에 관한 연구도 오랫동안 진행되어 왔다. 예를 들면 종양과 관련된 바이러스로 가장 처음 밝혀진 것들 중의 하나로서 닭의 로우스 사코마(Rous sarcoma) 바이러스가 있는바, 이 바이러스에 대한 연구는 레트로바이러스성 온코진(retroviral oncogene)이 세포 유전자로부터 유래한 것임을 밝히고 프로토온코진(protooncogene)이라는 개념을 확정하는 데 결정적 역할을 하였다.

그러나 이들 연구는 바이러스를 조류 또는 조류 배 세포(avian embryo

cells)에서 배양하는 것에 관한 연구로서, 아직까지 고등 진핵 세포의 이중
단백질을 조류 세포에서 발현시키는 것에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다.

[본 발명이 해결하려 하는 과제]

본 발명은 고등 진핵 세포의 단백질을 고효율로 발현시키기 위한 연구로서, 그 목적은 첫째 고등 진핵 세포의 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있는 새로운 이중 유전자 발현 시스템을 개발하여 제공하고, 둘째 상기한 이중 유전자 발현 시스템을 이용하여 포유류 동물 세포에서만 생산하여야 생물학적 활성이 있는 것으로 알려진 고등 진핵 세포의 단백질, 예를 들면 TPA, Factor VIII, EPO를 새로운 이중 유전자 발현 시스템을 이용하여 고효율로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고, 셋째 상기한 고등 진핵 세포 단백질중, 특히 EPO를 고효율로 생산할 수 있는 새로운 방법을 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

[과제를 해결하기 위한 수단]

상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 이중 유전자, 바람직하게는 EPO의 게놈 DNA, 더욱 바람직하게는 특수한 기법으로 클로닝된 EPO의 게놈 DNA와, 조류 세포에서 이중 단백질을 고효율로

생산하는 이중 유전자가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 각종 이중 유전자가 고효율로 발현되는 조류 세포, 바람직하게는 오리 배 세포(duck embryo cell, 이하 "DE"라 함)를 포함하는 이중 유전자 발현 시스템을 제공한다.

즉 본 발명은 바람직하게는 에리스로포이틴에 대한 유전자를 코딩하고 있는 DNA와, 상기 DNA가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 오리 배 세포를 포함하는 에리스로포이틴 생산 시스템을 제공한다.

또 본 발명은 에리스로포이틴 유전자를 코딩하고 있는 DNA를 벡터에 삽입하고, 상기한 벡터를 오리 배 세포에 트랜스펙션하고, 상기 트랜스펙션된 오리 배 세포를 배지에 배양하는 공정을 포함하는 에리스로포이틴의 제조방법을 제공한다.

상기한 본 발명의 에리스로포이틴 발현 시스템 및 에리스로포이틴의 제조방법에 있어서, 상기한 DNA는 에리스로포이틴을 코딩하고 있는 계놈 DNA가 바람직하며, 제5도 또는 제6도에 도시한 서열의 에리스로포이틴을 코딩하고 있는 DNA이면 더욱 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 에리스로포이틴 발현 시스템 및

에리스로포이틴의 제조방법에 있어서, 상기한 벡터는 HCMV의 MIEP를 발현프로모터로 사용하는 벡터가 바람직하다.

또 본 발명은 이중 유전자를 코딩하고 있는 DNA와, 상기 DNA가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 조류 세포를 포함하는 이중 유전자 발현 시스템을 제공한다.

또한 본 발명은 상기한 본 발명의 이중 유전자 발현 시스템을 배지에 배양하여 이중 유전자를 발현시키는 공정을 포함하는 이중 단백질의 제조방법을 제공한다.

그리고 본 발명은 고등 진핵 세포의 이중 유전자를 발현시키기 위한 숙주 세포로서 조류 세포를 제공한다.

또한 고등 진핵 세포의 이중 단백질을 암호화하고 있는 이중 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조류 세포를 배지에 배양하고, 상기 세포 및 배지로부터 이중 단백질을 분리하는 공정을 포함하는 이중 단백질의 제조방법을 제공한다.

상기한 본 발명의 이중 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이중

단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 이중 유전자는 예를 들면, EPO, TPA, Fcator VIII로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이중 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이중 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 벡터는 HCMV MIEP를 비롯하여, SV40 초기 프로모터, RSV LTR와 같이 고등진핵세포에서 프로모터 활성이 높은 프로모터 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이중 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이중 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 조류 세포는 예를 들면, DE, 닭 배 섬유아 세포(chicken embryo fibroblast cell, 이하 "CEF"라 함)로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이중 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 이중 유전자는 이중 단백질의 게놈 DNA, cDNA로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

[실시예]

이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기한 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 바람직한 일 실시예일 뿐 본 발명이 하기한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

본 발명자는 조류 세포를 이중 유전자 발현을 위한 숙주 세포로서 사용할 수 있는가에 대한 연구를 실시하였다. 이를 위해서 본 발명자는 하기한 이유로 닭과 오리로부터 배 세포 즉, DE, CEF를 선택하여 사용하였다. 첫째 이들 배 세포는 알로부터 쉽게 제조할 수 있으며, 이들은 간단 신속하게 분리된다. 둘째 닭과 오리 세포는 저렴한 비용으로 대량 배양이 가능하다. 셋째 특정 조류 세포, 예를 들면 닭 배 (chicken embryo)로부터 유래된 세포에서 만들어진 물질들은 이미 오랫동안 의약품으로 사용되고 있다. 예를 들면, 인플루엔자 바이러스에 대한 백신은 계란에서 제조되고 있다. 마지막으로 배양 조건, 배지 및 온도를 포함하여, 조류 배 세포에서 요구되는 조건들은 실질적으로 포유류 세포와 동일하여 이미 개발된 포유류 동물 세포의 배양방법을 큰 변화 없이 사용할 수 있으므로, 기존의 공정을 대치하거나 배양 조건을 최적화하는데 큰 문제가 없다.

I. 사용된 세포와 플라스미드

1. 세포

본 발명에서는 하기한 (표 1)과 같은 세포들을 사용하였다.

(표 1)

HeLa human cervical carcimoma cell	ATCC CCL2
Vero African green monkey kidney cell	ATCC CCL81
SV40의 야생형 T 항원을 형질전환시킨 COS-7 African green monkey kidney cell	ATCC CRL1651
CHO-K1 Chinese hamster ovary cell	ATCC CCL61
NIH3T3 contact-inhibited Swiss mouse embryo cells	ATCC CRL1651
Ad-5 transformed human embryonic kidney cells 293	ATCC CRL1591
SL-29 chicken embryo fibroblast cells	ATCC CRL1590
Duck embryo	ATCC CCL141 또는 직접 제조한 것 사용

상기한 세포들은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10 % 우태 혈청(fetal bovine serum, 이하 "FBS"라 함)을 첨가한 배지에서 배양하였다. 또한 오리 배 세포(duck embryo cell)는 ATCC CCL141을 사용하거나 연구실에서 직접 준비하였다. 이를 위하여는 수정후 10 내지 13일 되는 오리알로부터 배를 분리하여 트립신 처리하여 제조한 것을

사용하였다. 이들 조류 세포들은 비 필수아미노산과 10 % 우태 혈청을 포함하는 염 용액(Earle's balanced salt solution)을 첨가한 최소 배지(Eagle)에서 배양하였다. 이들 세포들은 약 30 회 이상 계대 배양할 수 있었다. 본 발명에서 사용한 각 배지에는 세균에 의한 오염 방지를 위하여 약 120 $\mu\text{g/ml}$ 의 페니실린 G(Sigma P-3032:1690 units/mg)와 200 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 (Sigma S-9137: 750 units/mg)을 첨가하여 사용하였다.

2. 플라스미드

조류 세포에서 이중 단백질 생산 여부와 생산의 효율성을 측정하기 위하여 사용된 CAT 측정 플라스미드로는 Hind III CAT 카세트 (Pharmacia, Piscataway, NJ로부터 구입)를 pRc/RSV 및 pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, California, U.S.A.로부터 구입)에 삽입하여 pRSV-CAT 및 pCMV-CAT를 제조하였다. pSV-CAT는 이미 본 발명자에 의하여 제조된 바 있는 플라스미드 p918을 사용하였다. EPO 생산 벡터로는 두 가지를 사용하였는데, pCMV-gEPO는 EPO 게놈 유전자 서열을 pRc/CMV의 Hind III 부위에 클로닝하여 제조하고, pSV-gEPO는 pSV918의 CAT 서열을 게놈 EPO 서열로 대체하여 제조하였다. 트랜스펙션의 효율을 측정하는데 사용된 pCMV-lacZ는 박테리아의 lacZ 유전자를 pRc/CMV의 Hind III 부위에

삽입하여 제조하였다.

II. 조류 세포에서 DNA 트랜스펙션

본 발명자는 고등 진핵 세포의 이중 유전자의 발현을 위한 숙주로 지금까지 사용되어오던 포유류 세포 대신 조류 세포가 사용 가능한가를 먼저 실험하였다. 지금까지 조류 세포는 바이러스 등의 배양에만 일부 사용되어 오고 있었으며, 고등 진핵 세포의 이중 유전자의 발현의 세포로 보고된 바가 없었다. 이와 같은 실험을 위하여 조류 세포에서 트랜스펙션을 효율적으로 실시하는 방법을 확립하는 것이 필요하다. 즉 세포에서 이중 유전자를 발현시키기 위해서는 DNA를 타겟 세포에 전이시키는 기술의 개발이 필요하다. 현재까지 조류 배 세포에 DNA를 전이하는 기술은 잘 알려져 있지 않다. 이에 따라 본 발명자는 포유류 동물 세포의 경우를 기초로 하여 DNA를 CEF와 DE에 효과적으로 전이하는 방법을 개발하였다.

본 발명자는 사용 가능한 여러 기술 중 칼슘 포스페이트-DNA 공침전 방법을 변형하여 하기한 방법으로 DNA 트랜스펙션을 행하였다. 왜냐하면 이 방법은 여러가지 부착 세포에서 성공적으로 사용되어진바 있고, 영구적인 세포주(stable cell line)를 제조하는데 사용할 수 있기 때문이다. 우리는

다양한 조건으로 실험을 행하였는 바, 하기한 방법이 최적임을 알아냈다.

100 mm 배양 접시에서 세포가 50 - 70 % 로 자랐을 때, HBS 완충용액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mM dextrose, 25 mM HEPES)에 총 10 μg DNA를 세포와 함께 상온에서 30 분간 배양하였다. FBS를 포함하는 일반적인 배지 10 ml을 첨가하고 37 °C에서 20 시간동안 배양하였다. 단 CHO-K1 세포는 8 시간동안 배양하였다. 세포는 100 μM 클로로퀸(chloroquine) 10 ml로 처리한 후 37 °C에서 3 시간동안 배양하였다. 10 ml의 새로운 배지로 교환한 후, 세포를 1 내지 2 일 동안 배양하였다. 배양 상등액을 수집하여 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 세포와 파편을 제거하였다. 이들 트랜스펙션 실험에 대한 대조 실험은 트랜스펙션을 하지 않은 세포로부터의 상등액과 EPO 서열을 갖고 있지 않은 플라스미드를 트랜스펙션한 상등액을 사용하여 실시하였다. 트랜스펙션의 효율을 측정하기 위해서는 세포를 pCMV-lacZ으로 트랜스펙션하고 PBS로 1회 세정하고 3 일후 0.5 % 글루탈알데하이드 (PBS내)로 10 분간 고정하고, 1 mM MgCl_2 를 포함하는 4 ml PBS로 각각 2 내지 10 분동안 2회 세정하였다. X-gal 염색을 위해서는 염색용액 [4 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 4 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 mM MgCl_2 and 400 $\mu\text{g/ml}$ X-gal (dimethylformamide

용액에 녹아 있음)를 포함하는 PBS]을 고정된 세포에 첨가하고, 37 °C에서 4 시간동안 배양하였다. 반응이 완료되면 세포를 PBS로 세정하고 염색된 세포를 PBS에서 유지시켰다.

CAT 활성은 하기한 방법으로 분석하였다.

트랜스펙션을 수행한 2 내지 3 일후 세포를 수확하고, PBS로 1 회 세정하고, 0.25 M Tris-HCl (pH7.5)를 사용하여 부유하였다. 총 단백질은 4회의 냉동과 해동을 반복하고 65 °C에서 7 분동안 배양하였다. 동일한 양의 단백질을 CAT 활성으로 분석하였다. 단백질의 양과 반응시간을 실험에 따라 다양하게 변형시켰다. 예를 들면, DE 세포로부터 준비한 세포 추출물의 CAT 활성은 매우 높아 단 10 μ g 단백질과 20 내지 30 분간의 반응 시간만 사용하여도 되었고, 이와 같은 조건하에서 다른 포유류 세포에서의 CAT 활성은 매우 낮거나 미미하였다. CAT 활성이 다른 세포에서 발견될 때면 DE 세포에서는 모든 14 C-클로람페니콜이 전환되었다. 14 C-클로람페니콜의 아세틸화된 형태의 전환율은 반응하지 않는 기질과 아세틸화된 형태를 포함하는 부위를 잘라 각각 액체 신타레이션 측정기로 방사성의 양을 측정하여 결정하였다.

이 때 본 발명자는 프로모터로서 먼저, HCMV의 MIE 부위 (major immediate early region)로부터의 프로모터 (HCMV MEIP)를 선택하여 사용하였다. 왜냐하면 이 프로모터는 여러 종류의 세포에서 고효율의 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 플라스미드 pCMV-CAT에서, 박테리아 CAT 유전자는 HCMV MEIP의 조절을 받는 위치에 있다. 음성 대조구 (negative control)로서, 프로모터는 있으나 CAT 서열은 포함하지 않는 플라스미드 pRc/CMV를 사용하였다. 이 플라스미드를 DE 및 CEF 세포로 트랜스펙션하고 CAT 활성을 측정하여 트랜스펙션과 유전자 발현의 효율을 측정하였다. 5회 이상 독립적으로 실시한 트랜스펙션으로부터 대표적인 예 하나를 제1도에 도시하였다. 제1도의 제1레인 및 제3레인에서와 같이 대조 플라스미드의 트랜스펙션에서는 두 세포에서 모두 CAT 활성이 나타나지 않았다. 그러나 pCMV-CAT를 트랜스펙션하였을 때에는 두 세포에서 모두 CAT 활성이 쉽게 검출되었다. 이외에도 다양한 트랜스펙션 분석을 행한 결과 CEF 세포에서보다 DE 세포에서 항상 CAT 활성이 높은 것으로 나타났다. 이들 두 세포들 사이에 CAT 활성의 차이는 10 내지 50 배의 차이가 났다.

이와 같은 결과는 조류 세포가 DNA로 쉽게 트랜스펙션되고 이중

유전자가 쉽게 발현될 수 있음을 나타낸다.

III. 조류 세포와 포유류 세포 사이 및 서로 다른 프로모터 사이의 유전자 발현 정도 비교

조류 세포와 포유류 세포에서 발현 효율성을 측정하기 위하여 하기한 세개의 다른 프로모터를 사용하여 조류 세포와 포유류 세포 사이의 유전자 발현을 비교하였다.

(1) SV40 초기 프로모터 (SV40 early promoter)

(2) HCMV MIEP (Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter)

(3) RSV LTR (Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat)

상기한 프로모터는 포유류 세포에서 매우 강력한 것으로 알려져 있으며, 또 종종 고율의 이중 유전자 발현을 위하여 사용되어 왔다.

상기한 프로모터와 CAT 융합 구조체(constructs)를 가지는 플라스미드들을 4개의 다른 세포, DE, CEF, CHO-K1, HeLa에 트랜스펙션한 후 CAT 활성을 측정하여 프로모터들 사이 및 세포 사이의 유전자 발현

효율을 비교하였다. 이와 같은 비교를 위하여 모든 트랜스펙션과 CAT 분석은 동시에 같은 조건하에서 실시하였다. 이와 같은 실험 결과의 한 예를 제2도에 도시하였다. 이 예에서 사용된 CAT 효소 측정 조건은, 세포 추출물 10 μ g, 30 분간 37 $^{\circ}$ C 에서 반응이다. 이와 같은 특정한 조건하에서, 상기 세개의 프로모터로부터 유래된 CAT 발현 수준은 CHO 및 HeLa 세포에서는 상대적으로 매우 낮거나 미미하였다 (제2도의 제7 내지 12 라인). 매우 많은 양의 단백질을, 예를 들면 80 - 100 μ g을, 보다 긴 반응시간, 예를 들면 90 분,동안 반응시켜야만 CAT 활성이 감지되었다. 이와 반대로 조류 세포에서는 CAT 활성이 쉽게 검출되었다 (제2도 제1, 2, 3, 5, 6 라인). 다만 SV40 프로모터의 경우에는 CEF 세포에서 CAT 활성이 쉽게 검출되지 않았다 (제2도 제4라인). 이상과 같은 결과로 포유류 세포에서보다 조류 배 세포에서 보다 효율적으로 이중 단백질이 생산됨을 확인하였다.

DE 세포에서는 CAT 활성이 쉽게 검출되었는데 특히HCMV MIEP는 매우 강력하게 발현을 유도하였다 (제2도 제2라인). 제2도에 사용된 CAT 반응의 조건은 다른 샘플에서도 적당한 CAT 활성을 나타내도록 선택한 것이다. CAT 반응을 제2도의 제2라인에서 사용한 단백질 샘플을 사용하여 제한된 조건(limiting condition)하에서 실시하면 (즉 CAT 전환이 50 %

미만이 되도록 조절하면) 다른 샘플의 CAT 활성은 실질적으로 검출이 되지 않았다. 그러므로 pCMV-CAT으로 트랜스펙션된 DE 세포로부터의 단백질 샘플과 다른 플라스미드들로 혹은 다른 세포들로 트랜스펙션된 것의 샘플들 사이의 CAT 활성의 차이는 적어도 100 배의 차이가 나는 것이다. 이와 같은 결과는 이중 유전자가 DE 세포내에서 특히 HCMV, MIEP의 조절하에서 매우 효과적으로 발현됨을 의미한다.

IV. DE 세포에서 높은 유전자의 발현 원인 분석

상기한 실험 (III. 조류 세포와 포유류 세포 사이 및 서로 다른 프로모터 사이의 유전자 발현 정도 비교)에서는 DE 세포에서 이중 단백질, 즉 CAT가 매우 높은 효율로 발현됨을 밝혔다. 이 원인을 분석하기 위하여 하기한 방법을 사용하였다.

먼저 DE 세포에서의 높은 CAT의 발현은 DE 세포를 포함한 조류 세포가 강한 유전자 발현을 유도할 수 있기 때문이기 보다는 세포로의 효과적인 트랜스펙션의 결과일 가능성이 있다. 즉, 트랜스펙션된 세포의 숫자가 많아서 발현량이 높을 가능성이 있는 것이다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위하여 본 발명자는 pCMV-lacZ를 DE 및 다른 동물 세포에 트랜스펙션시켰다.

트랜스펙션후 세포를 X-gal로 염색하고 청색 세포의 수를 측정하여
트랜스펙션 효율을 측정하고 그 결과를 제3도에 도시하였다. 제3도에서
도시한 바와 같이 염색된 세포의 수는 DE 및 다른 동물 세포에서 항상
유사하였다.

따라서 유전자 발현 효율이 조류 세포에서 높은 것은 DE 세포를 포함한
조류 세포에서의 유전자 발현 효율이 포유류 세포에서의 유전자 발현 효율
보다 월등히 높는데 기인함을 나타낸다.

V. 인체 EPO의 클로닝

DE 세포를 실제로 의약적으로 유용한 인체 단백질의 발현에 사용할 수
있는가 여부를 확인하기 위하여 본 발명자는 인체 EPO 유전자를 암호화하고
있는 게놈 DNA를 분리하여 실험하였다. 이 EPO 유전자를 대상으로 한
이유는 이 단백질이 분비형 단백질 (secretion protein)이어서 DE 세포가
이러한 종류의 단백질을 제대로 분비할 수 있는 확인할 수 있기 때문이다.
본 발명자는 EPO의 cDNA 대신 게놈 클론을 사용하였는데, 이는 인체의
유전자가 DE 세포에서 제대로 스플라이싱되어 기능을 갖는 mRNA를 생산할
수 있는지를 검토하기 위하여다.

EPO 유전자의 클로닝을 위하여 사용된 DNA는 두 사람의 혈액세포로부터 만들어졌다. 헤파린으로 처리한 인체 혈구로부터 인간의 혈액 림포사이트를 Ficoll-Hypaque 구배 원심분리 방법으로 분리하였다. 이로부터 총 DNA를 제조하고 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머 (제4도 참조)를 사용하여 하기한 방법에 따라 PCR에 사용하였다. 시작 코돈 주위에는 GC가 매우 많아, 두쌍의 프라이머를 사용하여 이단계 PCR을 실시하여 EPO 서열을 클로닝하였다.

EPO에 대한 게놈 DNA를 얻기 위하여, 전체 세포를 TES (10 mM Tris-HCl pH7.8; 1 mM EDTA; 0.7 % SDS)를 사용하여 분해하고 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로티나아제 K로 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간동안 반응시킨 후, 페놀:클로로포름 추출, 에탄올 침전처리하였다. EPO 유전자에 대하여 특이성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 전체 게놈 유전자 0.1 μg 을 사용하여 PCR을 수행하였다.

프라이머 #25 (sense, 5' to 3') : GAAGCTGATAAGCTGATAACC

프라이머 #33 (antisense, 5' to 3') : TGTGACATCCTTAGATCTCA

이 샘플을 하기한 조건, 즉 92 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 분간 변성, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 프라이머 어닐링, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 분간 중합을 30 회 반복하여 증폭하였다. 이와

같은 반응에 의하여 증폭된 DNA 절편들은 N-말단 부위에 처음 13 개 뉴클레오티드를 포함하고 있지 않았다. 그래서 하기한 프라이머를 사용하여 두번째 PCR을 수행하였다 (제4도 참조).

프라이머 #12 (sense, 5' to 3') :

CAAGCTTCGGAGATGGGGGTGCACAATGTCCTGCCTGGCTGTGGC

프라이머 #9 (antisense, 5' to 3') :

CAAGCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGC

두번째 PCR에 의하여 증폭된 DNA를 pCRII (Invitrogene)에 클로닝하였으며, 증폭된 DNA는 HindIII 자리를 양끝에 갖춤으로 쉽게 다양한 벡터에 삽입할 수 있었다. 본 실험에서는 EPO 게놈 유전자를 HCMV MIEP 또는 SV40 초기 프로모터 (SV40 early promoter)의 조절하에 놓아 각각 pCMV-gEPO 및 pSV-gEPO 등을 제조하였다.

VI. 클로닝된 EPO 유전자의 염기 서열 분석

상기한 방법으로 클로닝된 EPO는 기존의 EPO 게놈 유전자와는 부분적으로 다른 구조를 갖고 있었다. 즉 야생형의 EPO 게놈 유전자에는

5개의 코딩 부위가 존재하며 4개의 인트론들에 의하여 떨어져 위치하고 있다.

그러나 상기한 (V. 인체 EPO의 클로닝) 공정에서 클로닝한 클론은 첫번째 코딩 부위와 두번째 코딩 부위가 밀착하여 한개의 코딩 부위를 형성하고 있어 4개의 코딩 부위와 3개의 인트론으로 형성되어 있다.

상기한 방법으로 클로닝된 2개의 EPO 유전자의 게놈 DNA의 염기서열은 제5도 및 제6도에서 보여지는 바와 같다 (제5A도 내지 제5C도는 이하 "HE-EPO"라 하고, 제6A도 내지 제6C도는 이하 "SH-EPO"라 한다). 이와 같이 본 연구에서 클로닝된 EPO 유전자는 이미 종래에 알려진 두개의 EPO 게놈 DNA(각각 "AM-EPO"와 "GI-EPO"라 함)와 많은 차이점이 있었다(제7도, 제8도 참조). 특히 본 연구를 통하여 클로닝된 EPO 유전자는 3개의 아미노산이 종래의 EPO와 달랐다. HE-EPO는 차이점이 C-말단 부위에 집중되어 있는 반면 SH-EPO는 3개의 차이점이 전 폴리펩타이드에 걸쳐 분포되어 있었다(제8도 참조). 예를 들면, 191개의 EPO 아미노산중 AM-EPO와 GI-EPO는 36번째, 100번째, 170번째 아미노산이 각각 세린, 알라닌, 발린인 반면, SH-EPO는 알지닌, 세린, 타이로신이였다. 또한 기존의 AM-EPO 및 GI-EPO는 170번째, 177번째, 191번째가 각각 발린, 라이신, 알지닌인 반면 HE-EPO는 타이로신, 글루타민산, 글라이신이였다.

VII. DE 세포에서 EPO의 발현

EPO 발현 벡터를 DE, CEF, CHO, HeLa, VERO, 293T를 포함하는 다양한 세포에 트랜스펙션하였다. VERO 세포는 이중 유전자의 발현에 자주 사용되기 때문에 사용하였고, 293T 세포는 DNA 트랜스펙션이 높은 효율로 이루어지고, 아데노바이러스의 E1A, E1B, SV40의 T 항원과 같은 바이러스성 트랜스액티베이터 (transactivator)를 가지고 있어 유전자의 발현이 매우 높기 때문에 사용하였다. 트랜스펙션을 실시하고 2 내지 3 일후, 배양 상등액내의 EPO의 양을 효소 결합 면역흡착 방법 (enzyme linked immunoadsorbent assay)으로 측정하였다 (R & D systmes Inc., Catalog number DEP00, Minnesota, U.S.A.). 이와 같은 분석 결과는 하기한 (표 2)에 나타내었다.

(표 2)

세 포	(mIU/ml)		
	HCMV MIEP	SV40 earyl promoter	HCMV/SV40
293T	314	17.5	18
CHO	139.4	10.4	13.5
VERO	250	10.7	23.5
NIH3T3	89	79.4	1.1
DE	4335	13.8	314.8

상기한 (표 2)에서 알 수 있는 바와 같이 SV40 초기 프로모터를
사용하였을 때 세포들 사이에서 EPO 생산량의 차이는 거의 없었다. 그러나
HCMV MIEP를 사용하였을 때는 DE 세포가 다른 세포들에 비하여 월등히
높은 EPO를 생산하였다. HCMV MIEP는 모든 실험한 세포들에서 SV40
초기 프로모터에 비하여 높은 EPO 수준을 나타냈다. 이와 같은 차이는 특히
DE 세포에서 분명하였는데, 무려 315배나 많은 EPO를 생산하였다. 실험에
사용된 여러 세포 중에서 DE 세포가 항상 가장 많은 양의 EPO를
생산하였다. CHO 세포는 현재 인체에 사용되는 EPO를 생산하는 세포의
모주이다. 그러나 이들 CHO 세포에서 EPO의 수준은 DE 세포에 비하여
적어도 30배가 낮다. 상기한 결과는 인체 EPO가 DE 세포에서 효과적으로
생산되어 방출됨을 의미하며 HCMV MIEP가 DE 세포에서 이종 유전자
발현을 매우 효율적으로 유도할 수 있는 프로모터임을 의미한다.

결론적으로 본 발명자는 DE 세포가 박테리아 및 인체의 유전자를 매우
높은 효율로 발현함을 확인하였다. 사용된 프로모터 모두가 다른
세포에서보다 DE 세포에서 유전자의 고율 발현을 유도하는 것임을
확인하였다. 특히 HCMV MIEP는 DE 세포에서 매우 우수한 효과를
나타냄을 확인하였다. 이종 유전자의 높은 발현은 트랜스펙션된 세포수가

많기 때문이 아니었다. EPO 게놈 유전자 서열을 포함하고 있는 발현 벡터의 트랜스펙션으로 말미암아 배양 상등액에서 많은 양의 EPO를 생산하는 것으로 보아 DE 세포가 스플라이싱 및 분비를 적절히 수행하였음을 알 수 있다.

VIII. 오리 배 세포에서 생산된 EPO의 생물학적 활성

상기한 방법에 따라 오리 배 세포에서 생산된 EPO의 생물학적 역가가 포유류 세포에서 생산된 것과 동일한 것인가를 확인하기 위하여, 하기한 바와 같이 지라세포 생증식 측정 방법을 사용하여 활성을 측정하였다.

먼저 C57BL/6 × C3H의 제1대 잡종 생쥐(F1 hybrid mice)에 페닐하이드라진 60 mg/kg/body/day(대략 1.2 mg/0.1 ml)을 이틀간 주사하고, 마지막 주사일로부터 3일후에 생쥐를 치사하여 지라를 적출하여 100 mesh 망에서 PBS를 첨가하며 호모게나이저를 사용하여 균질용액을 얻었다. 상기 균질화된 용액을 림프프렙(lymphoprep: NYCOMED PHARMA AS)에 1:2로 적가하여 2000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상기 원심분리 결과 경계면에 모인 세포를 수확하여 1500 rpm에서 3회 PBS로 세척하고 원심분리하였다. 24 웰 플레이트에 최종 부피가 4×10^6 세포수/ml가 되도록 EPO 대조군 및 샘플을 첨가하여 22시간 배양하였다. 4 uci/l ^3H

티미딘으로 처리하고 2 시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 PBS로 2회 세정한 후 메탄올로 고정하고 0.3 N NaOH/0.1 % SDS로 세포를 파괴한 후 LSC 용액을 사용하여 세포내의 트리티움양을 측정하였다.

제9도는 인간의 혈액에서 EPO의 농도를 측정하는데 사용되고 있는 키트를 사용하여 ELISA 방법으로 DE에서 생산된 EPO의 농도와 바이오어세이(bioassay)를 통하여 얻어진 EPO의 농도를 비교한 것이다. 바이오어세이시에는 현재 인간에 실제 사용되고 있는 EPO(CILAG AG International)을 대조군(standards)로 사용하였는바, 이는 포유류 동물 세포에서 생산된 것이다. 이 두가지 방법으로 얻어진 EPO 값은 그 비율이 1 ± 0.15 였는바, 서로의 값이 매우 유사함을 보여주고 있다. 이는 DE에서 생산된 EPO가 실제 임상에 사용되고 있는 재조합 EPO와 매우 유사한 생물학적 활성을 소지하고 있음을 보여 준다.

그 결과 본 발명의 일 실시예에 따라 오리 배 세포를 이용하여 제조된 EPO는 포유류 동물세포에서 제조된 종래의 EPO와 동일한 역가를 나타내었다.

[효 과]

상기한 바와 같이 본 발명은 오리 배 세포 등과 같은 조류 세포가 이중 유전자, 특히 고등 진핵 세포의 이중 단백질, 예를 들면 EPO,에 대한 이중 유전자를 높은 효율로 발현시키며, 따라서 이러한 조류 세포를 이용할 경우 많은 양의 이중 단백질을 효과적으로 제조할 수 있다.

4. 특허청구의 범위

1. 에리스로포이틴에 대한 유전자를 코딩하고 있는 DNA와;

상기 DNA가 삽입되는 벡터와;

상기 벡터가 발현되는 오리 배 세포를;

포함하는 에리스로포이틴 생산 시스템.

2. 제 1 항에 있어서, 상기한 DNA는 에리스로포이틴을 코딩하고 있는
게놈 DNA인 에리스로포이틴 생산 시스템.

3. 제 1 항에 있어서, 상기한 DNA는 제5도 또는 제6도에 도시한 서열의
에리스로포이틴을 코딩하고 있는 DNA인 에리스로포이틴 생산 시스템.

4. 제 1 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, RSV LTR,
HCMV MIEP로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인
에리스로포이틴 생산 시스템.

5. 에리스로포이틴 유전자를 코딩하고 있는 DNA를 벡터에 삽입하고;

상기한 벡터를 오리 배 세포에 트랜스펙션하고;

상기 트랜스펙션된 오리 배 세포를 배지에 배양하는;

공정을 포함하는 에리트로포이틴의 제조방법.

6. 제 5 항에 있어서, 상기한 DNA는 에리트로포이틴을 코딩하고 있는
계놈 DNA인 에리트로포이틴의 제조방법.

7. 제 5 항에 있어서, 상기한 DNA는 제5도 또는 제6도에 도시한
에리트로포이틴을 코딩하고 있는 DNA인 에리트로포이틴의 제조방법.

8. 제 5 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, RSV LTR,
HCMV MIEP로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인
에리트로포이틴의 제조방법.

9. 이종 유전자를 코딩하고 있는 DNA와;

상기 DNA가 삽입되는 벡터와;

상기 벡터가 발현되는 조류 세포를;

포함하는 이중 유전자 발현 시스템.

10. 제 9 항에 있어서, 상기한 이중 유전자는 TPA, Factor VIII, EPO로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이중 유전자 발현 시스템.

11. 제 9 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, HCMV MIEP, RSV LTR로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 이중 유전자 발현 시스템.

12. 제 9 항에 있어서, 상기한 조류 세포는 DE, CEF로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이중 유전자 발현 시스템.

13. 고등 진핵 세포의 이중 유전자를 발현시키기 위한 숙주 세포로서 조류 세포.

14. 제 9 항의 이중 유전자 발현 시스템을 배지에 배양하여 이중 유전자를 발현시키는 공정을 포함하는 이중 단백질의 제조방법.

15. 제 14 항에 있어서, 상기한 이중 유전자는 TPA, Factor III, EPO로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이중 단백질의 제조방법.

16. 제 14 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, HCMV MIEP, RSV LTR로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인 이종 단백질의 제조방법.

17. 제 14 항에 있어서, 상기한 조류 세포는 DE, CEF로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 단백질의 제조방법.

18. 제 14 항에 있어서, 상기한 이종 유전자는 이종 단백질의 게놈 DNA, cDNA로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 단백질의 제조방법.

19. 고등 진핵 세포의 이종 단백질을 암호화하고 있는 이종 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조류 세포를 배지에 배양하고;

상기 세포 및 배지로부터 이종 단백질을 분리하는;

공정을 포함하는 이종 단백질의 제조방법.








20. ~~하가한~~ 서열의 EPO 게놈 유전자.
제15도 또는 제16도에 도시한



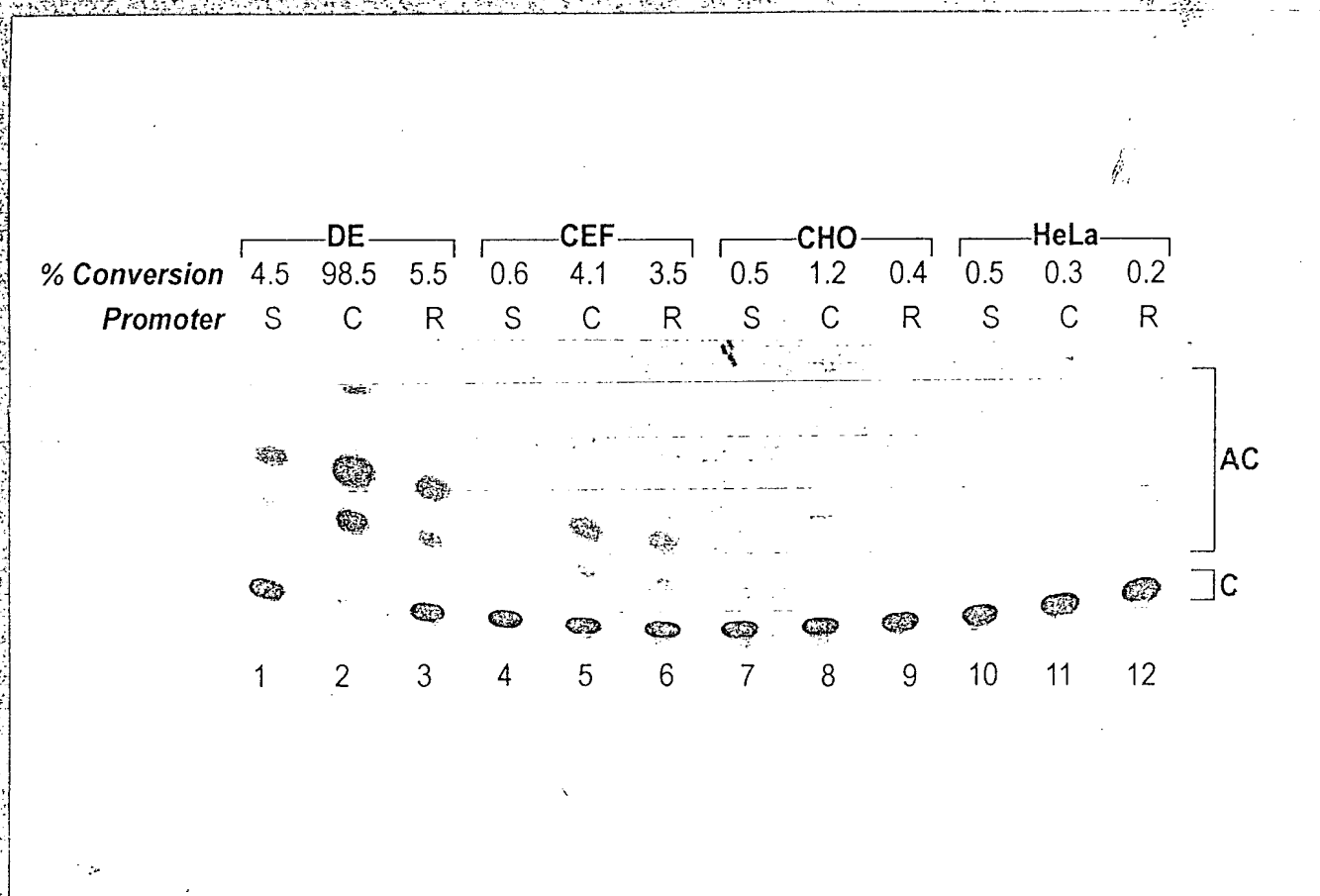
요 약 서

EPO의 게놈 DNA 등의 이중 유전자 DNA와 상기 DNA가 삽입되어 있어
해당 유전자를 고효율로 생산하는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 오리 배
세포와 같은 조류 세포를 포함하는 이중 단백질 발현 시스템을 배양하여
에리스로포이틴과 같은 이중 단백질을 제조할 경우, 이중 단백질을 고효율로
발현시켜 많은 양의 이중 단백질을 효과적으로 생산할 수 있다.

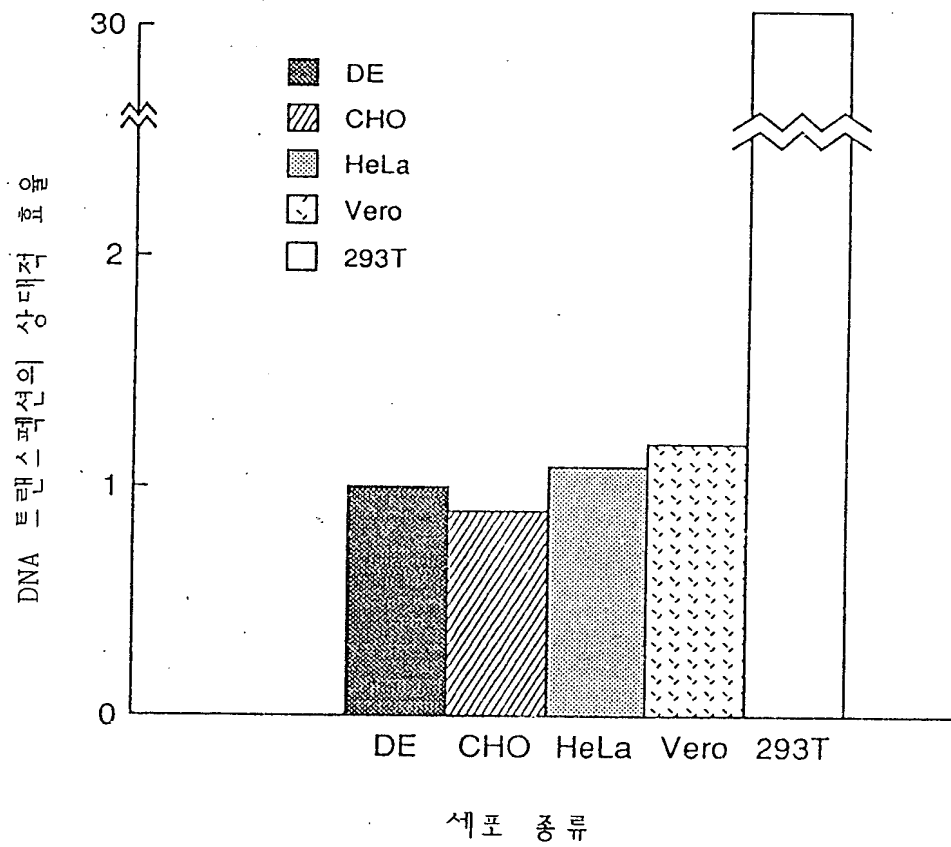
III 1 五

% Conversion CAT	DE		CEF		
	<0.1	72.4	<0.1	3.2	
	-	+	-	+	
				] AC
					
				] C
	1	2	3	4	

III 2 도



제 3 도

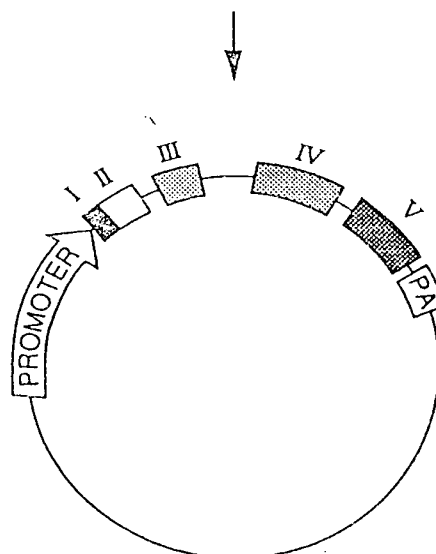
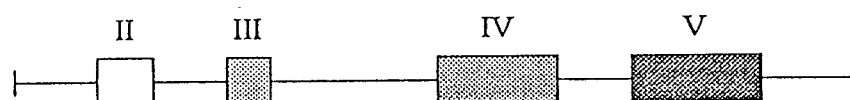


III 4 II

Exons



Primers



第5A卷

			10			20			30			40		
ATG	GGG	GTG	CAC	GAA	TGT	CCT	GCC	TGG	CTG	TGG	CTT	CTC	CTG	TCC
M	G	V	H	E	C	P	A	W	L	W	L	L	L	S

	50			60				70			80			90
CTG	CTG	TCG	CTC	CCT	CTG	GGC	CTC	CCA	GTC	CTG	GGC	GCC	CCA	CCA
L	L	S	L	P	L	G	L	P	V	L	G	A	P	P

			100				110				120				130			
CGC	CTC	ATC	TGT	GAC	AGC	CGA	GTC	CTG	GAG	AGG	TAC	CTC	TTG	GAG				
R	L	I	C	D	S	R	V	L	E	R	Y	L	L	E				

140 150 160 -- intron --

 | | |

GCC AAG GAG GCC GAG AAT ATC ACG

 A K E A E N I T

```

-- intron --      420          430          440          450
                   |           |           |           |
                   A CGG GCT GTG CTG AAC ACT GCA GCT TGA ATG
                   T  G  C  A  E  H  C  S  L  N

```

		460				470				480				490			
AGA	ATA	TCA	CTG	TCC	CAG	ACA	CCA	AAG	TTA	ATT	TCT	ATG	CCT	GGA			
E	N	I	T	V	P	D	T	K	V	N	F	Y	A	W			

제5B도

500 510 -- intron --

| |

AGA GGA TGG AG

K R M E

-- intron --

1120

|

GT CGG GCA

V G Q

1130 1140 1150 1160 1170

| | | | |

GCA GGC CGT AGA AGT CTG GCA GGG CCT GGC CCT GCT GTC GGA AGC

Q A V E V W Q G L A L L S E A

1180 1190 1200 1210

| | | |

TGT CCT GCG GGG CCA GGC CCT GTT GGT CAA CTC TTC CCA GCC GTG

V L R G Q A L L V N S S Q P W

1220 1230 1240 1250 1260

| | | | |

GGA GCC CCT GCA GCT GCA TGT GGA TAA AGC CGT CAG TGG CCT TCG

E P L Q L H V D K A V S G L R

1270 1280 1290 1300

| | | |

CAG CCT CAC CAC TCT GCT TCG GGC TCT GGG AGC CCA G

S L T T L L R A L G A Q

제5C도

1400 -- intron --

1440

|
 AAG GAA GCC
 K E A

1450

1460

1470

1480

| | | |
 ATC TCC CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC
 I S P P D A A S A A P L R T I

1490

1500

1510

1520

1530

| | | | |
 ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC
 T A D T F R K L F R V Y S N F

1540

1550

1560

1570

| | | |
 CTC CGG GGA GAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC TGC AGG ACA
 L R G E L K L Y T G E A C R T

1580

|
 GGG GAC GGA TGA
 G D G -

제6A도

		10				20				30				40	
ATG	GGG	GTG	CAC	GAA	TGT	CCT	GCC	TGG	CTG	TGG	CTT	CTC	CTG	TCC	
M	G	V	H	E	C	P	A	W	L	W	L	L	L	S	

		50				60				70				80		90
CTG	CTG	TCG	CTC	CCT	CTG	GGC	CTC	CCA	GTC	CTG	GGC	GCC	CCA	CCA		
L	L	S	L	P	L	G	L	P	V	L	G	A	P	P		

				100				110					120			130
CGC	CTC	ATC	TGT	GAC	AGA	CGA	GTC	CTG	GAG	AGG	TAC	CTC	TTG	GAG		
R	L	I	C	D	R	R	V	L	E	R	Y	L	L	E		

		140				150				160	--intron --					
GCC	AAG	GAG	GCC	GAG	AAT	ATC	ACG									
A	K	E	A	E	N	I	T									

		410				420				430				440		450
						ACG	GGC	TGT	GCT	GAA	CAC	TGC	AGC	TTG	AAT	GAG
						T	G	C	A	E	H	C	S	L	N	E

				460				470					480			490
AAT	ATC	ACT	GTC	CCA	GAC	ACC	AAA	GTT	AAT	TTC	TAT	GCC	TGG	AAG		
N	I	T	V	P	D	T	K	V	N	F	Y	A	W	K		

제6B도

500	510	-- intron --	
AGG ATG GAG			
R M E			
-- intron --		1120	
		GTC GGG CAG CAG	
		V G Q Q	
1130	1140	1150	1160 1170
GCC GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA TCT GTC			
A V E V W Q G L A L L S E S V			
1180	1190	1200	1210
CTG CGG GGC CAG GCC CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAA CCG TGG GAG			
L R G Q A L L V N S S Q P W E			
1220	1230	1240	1250 1260
CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT GGC CTT CGC AGC			
P L Q L H V D K A V S G L R S			
1270	1280	1290	1300
CTC ACC ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG			
L T T L L R A L G A Q			

제6C도

-- intron --

1430

1440

AGG AAG CCA TCT
K E A I

1450

1460

1470

1480

CCC CTC CAG ATG CGG CCT CAG CTG CTC CAC TCC GAA CAA TCA CTG
S P P D A A S A A P L R T I T

1490

1500

1510

1520

1530

CTG ATA CTT TCC GCA AAC TCT TCC GAG TCT ACT CCA ATT TCC TCC
A D T F R K L F R V Y S N F L

1540

1550

1560

1570

GGG GAA AGC TGA AGC TGT ACA CAG GGG AGG CCT GCA GGA CAG GGG
R G K L K L Y T G E A C R T G

1580

ACA GAT GAC
D R -

제7A도

AM	ATGGGGGTGCACG(GTGAGT-----intron-----	
GI	ATGGGGGTGCACG(GTGAGT-----intron-----	
SH	ATGGGGGTGCACG-----intron 없음 -----	
HE	ATGGGGGTGCACG-----intron 없음 -----	
	-----TTCTAG)AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
	-----TTCTAG)AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
	-----AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
	-----AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
AM	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
GI	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
SH	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
HE	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
AM	GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
GI	GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
SH	GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
HE	GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
AM	AATATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
GI	AATATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
SH	AATATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
HE	AATATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
AM	AGGGCTTCAGGGAACTCCTCCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
GI	AGGGCTTCAGGGAACTCCTCCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
SH	AGGGCTTCAGGGAACTCCTCCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
HE	AGGGCTTCAGGGAACTCCTCCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	250

제7B도

AM	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
GI	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
SH	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
HE	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCTACATAAGAATAAGTCT	300

AM	GGTGGCCCCAAACCATAACCTGGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
GI	GGTGGCCCCAAACCATAACCTGGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
SH	GGTGGCCCCAAACCATAACCTGGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
HE	GGTGGCCCCAAACCATAACCTGGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	350

AM	TCCTACG CCTGTGG CCAGGG CAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	398
GI	TCCTACG CCTGTGG CCAGGG CAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	396
SH	TCCTACG CCTGTGG CCAGGG CAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	398
HE	TCCTACG CCTGTGG CCAGGG CAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	400

AM	CGGGCTGTGTGCATTT CAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	448
GI	CGGGCTGTGTGCATTT CAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	446
SH	CGGGCTGTGTGCATTT CAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	448
HE	CGGGCTGTGTGCATTT CAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	450

AM	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	498
GI	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	496
SH	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	498
HE	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	500

AM	ATGGAGGTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTCCTTTCTTTTGGAGAATCTC	548
GI	ATGGAGGTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTCCTTTCTTTTGGAGAATCTC	546
SH	ATGGAGGTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTCCTTTCTTTTGGAGAATCTC	546
HE	ATGGAGGTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTCCTTTCTTTTGGAGAATCTC	550

제7C도

AM	ATTTGCGAGCCTGATTITGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGGGAAAGGTA	598
GI	ATTTGCGAGCCTGATTITGGATGAAAGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTA	596
SH	ATTTGCGAGCCTGATTITGGATGAAAGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTA	596
HE	ATTTGCGAGCCTGATTITGGATGAAAGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTA	600

AM	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCAGAGGCTCAGTCTAT	648
GI	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCAGAGGCTCAGTCTAT	646
SH	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCAGAGGCTCAGTCTAT	646
HE	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCAGAGGCTCAGTCTAT	650

AM	AATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	698
GI	AATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	696
SH	AATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	696
HE	AATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	700

AM	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATT	748
GI	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATT	746
SH	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATT	746
HE	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATT	750

AM	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTT	798
GI	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTT	796
SH	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTT	796
HE	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTT	800

AM	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTTGAGGCTGCAG	848
GI	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTTGAGGCTGCAG	846
SH	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTTGAGGCTGCAG	846
HE	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTTGAGGCTGCAG	850

제7D도

AM	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	898
GI	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	896
SH	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	896
HE	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	900

AM	CTGTCTCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	948
GI	CTGTCTCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	946
SH	CTGTCTCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	946
HE	CTGTCTCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	950

AM	TACATTCATTATTCATTCACCTCACTCACTCACTCATTCAATTCATTCATTC	998
GI	TACATTCATTATTCATTCACCTCACTCACTCACTCATTCAATTCATTCATTC	996
SH	TACATTCATTATTCATTCACCTCACTCACTCACTCATTCAATTCATTCATTC	996
HE	TACATTCATTATTCATTCACCTCACTCACTCACTCATTCAATTCATTCATTC	1000

AM	ATTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1048
GI	ATTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1050
SH	ATTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1047
HE	ATTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1048

AM2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCA	1098
GI2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCA	1100
SH2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCA	1197
HE2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCA	1198

AM2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1148
GI2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1150
SH2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1147
HE2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1148

제7E도

AM	CTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAA	1198
GI	CTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAA	1200
SH	CTGGCCCTGCTGTCGGAATCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAA	1197
HE	CTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAA	1198

AM	CTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1248
GI	CTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1250
SH	CTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1247
HE	CTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1248

AM	GTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1298
GI	GTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1300
SH	GTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1297
HE	GTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1298

AM	AGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCCTTTCTGTAAGAAGGGGAGAAGGG	1348
GI	AGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCCTTTCTGTAAGAAGGGGAGAAGGG	1350
SH	AGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCCTTTCTGTAAGAAGGGGAGAAGGG	1347
HE	AGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCCTTTCTGTAAGAAGGGGAGAAGGG	1348

AM	TCTTGCTAAGGAGTACAGGAACCTGTCCGTATTCTTCCCTTTCTGTGGCA	1398
GI	TCTTGCTAAGGAGTACAGGAACCTGTCCGTATTCTTCCCTTTCTGTGGCA	1400
SH	TCTTGCTAAGGAGTACAGGAACCTGTCCGTATTCTTCCCTTTCTGTGGCA	1397
HE	TCTTGCTAAGGAGTACAGGAACCTGTCCGTATTCTTCCCTTTCTGTGGCA	1398

AM	CTGCAGCGACCTCCTGTTTTCTCCTTGGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1448
GI	CTGCAGCGACCTCCTGTTTTCTCCTTGGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1450
SH	CTGCAGCGACCTCCTGTTTTCTCCTTGGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1447
HE	CTGCAGCGACCTCCTGTTTTCTCCTTGGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1448

제7도

AM	CAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTC	1498
GI	CAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTC	1500
SH	CAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGATACTTTC	1497
HE	CAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTC	1498

AM	CGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCT	1548
GI	CGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCT	1550
SH	CGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCT	1547
HE	CGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCT	1548

AM	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA-	1585
GI	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA-	1587
SH	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA	1585
HE	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA-	1585

제8도

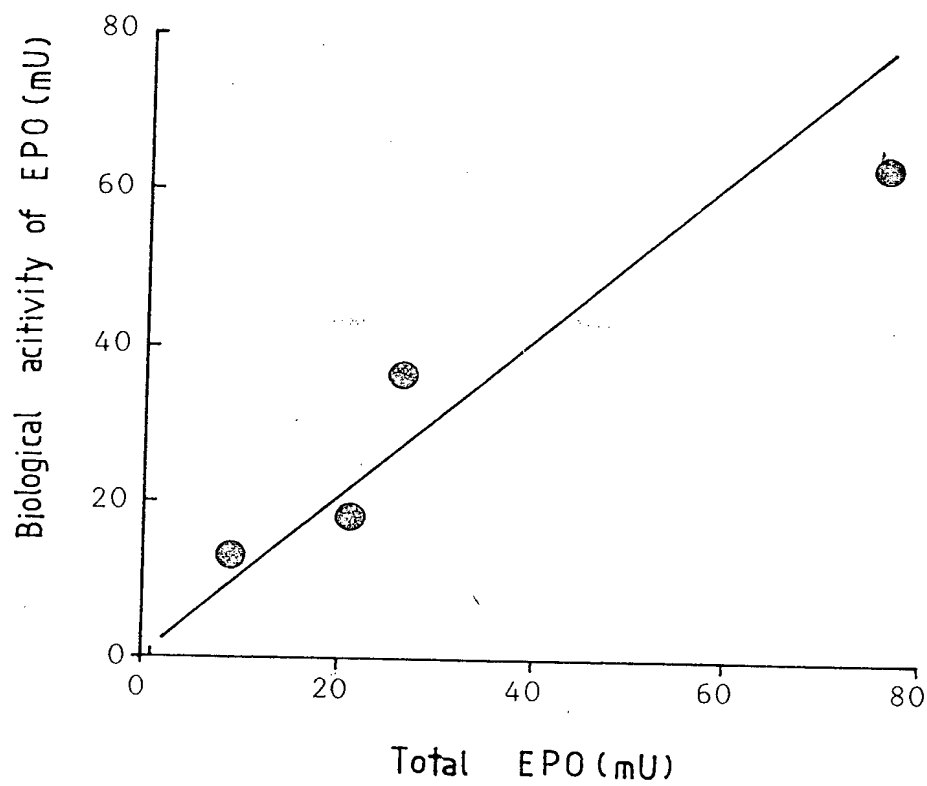
AM/GI	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE	50
SH	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDRRVLERYLLEAKEAE	50
HE	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE	50

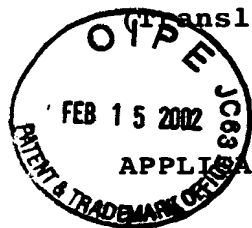
AM/GI	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA	100
SH	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSES	100
HE	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA	100

AM/GI	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPD	150
SH	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPD	150
HE	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPD	150

AM/GI	AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDR	193
SH	AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDR	193
HE	AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDC	193

附 9 五





(Translation)

APPLICATION FOR PATENT

APPLICANT: Il-dong Pharm Co., Ltd., a company of the Republic of Korea, of 60, Yangjae-dong, Seocho-ku, Seoul

ATTORNEYS: KIM, Won-Ho; KIM, Jae-Man

INVENTORS : KIM, Sun-Young, a citizen of the Republic of Korea, of 109-1304, Doosan Apt., Kumho-3ga-dong, Sungdong-ku, Seoul, Republic of Korea

TITLE OF INVENTION: ERYTHROPOIETIN EXPRESSION SYSTEM USING A DUCK EMBRYO CELL

Submitted herewith is/are an application identified above pursuant to Article 42 of the Patent Act.

This 24th day of August, 1995

To the Commissioner of
the Korean Industrial Property Office

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

Application Number: Patent Application No. 1995-26391

Date of Application: August 24, 1995

Applicant(s): IL DONG PHARM Co., Ltd.

This 18th day of December, 2001

COMMISSIONER

I, the undersigned, who have prepared English translation which is attached herewith, hereby declare that the aforementioned translation is true and correct translation of officially certified copy of the Korean Patent Application No. 1995-26391 filed on August 24, 1995.

This 3rd day of January, 2002

Translator:



PARK, Jeong-Won

SPECIFICATION

1. TITLE OF THE INVENTION

HETEROLOGOUS PROTEIN PRODUCTION SYSTEM USING
AVIAN CELLS

2. DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the expression of the bacterial CAT gene in avian cells. Duck embryo cell (hereinafter "DE") and Chicken embryo fibroblast cell (hereinafter "CEF") were transfected with expression vector containing (+) or lacking (-) the CAT sequence. Expression of CAT gene was induced by HCMV(human cytomegalovirus) MIEP(major immediate-early promoter). CAT activity was measured by determining the amount of acetylated chloramphenicol (AC) produced from ^{14}C -chloramphenicol. The values shown are from one representative of more than five independent assays. For this particular experiment, 10 ug of protein was reacted with ^{14}C -chloramphenicol for 20 min at 37 °C.

Fig. 2 shows the comparison of CAT gene expression between various cell types and between different promoters. The three promoter-CAT fusion constructs were transfected into DE, CEF, CHO-K1, and HeLa

cells, and CAT activity was measured as described in Fig. 1. S : SV40 early promoter; C : HCMV MIEP; R : RSV LTR. The values shown are from one representative of three independent assays. For this particular experiment, 10 ug of protein was reacted with ^{14}C -chloramphenicol for 30 min at 37 °C .

Fig. 3 shows the efficiency of DNA transfection in various cells. pCMV-lacZ constructs was transfected into DE, CHO, Vero, HeLa, and 293T cells by calcium phosphate-DNA coprecipitation using the conditions used for the experiments shown in Fig. 2. Two days after transfection, cells were fixed and stained with X-gal. The number of blue cells per 60 mm tissue culture plate was counted. The total number of cells between plates were comparable at $1 - 3 \times 10^5$. Transfection efficiency was calculated relative to DE cells.

Fig. 4 shows the schematic diagram for cloning of human EPO and construction of expression vectors. The five blocks represent the five coding regions of EPO. The first PCR was performed using primers 25 and 33. The amplified DNA fragment was cloned and subjected to a second PCR using primers 12 and 9. The wavy tale in primer 12 contains the nucleotide sequence from the first coding region. Therefore, the second PCR generates the entire coding sequence of EPO. Primers 12

and 9 contain HindIII linkers at their 5' ends. The amplified and cloned EPO DNA was cloned into various expression vectors.

Fig. 5A to 5C are various HE-EPO genomic DNA sequences cloned by the present invention.

Fig. 6A to 6C are various HE-EPO genomic DNA sequences and amino sequences cloned by the present invention.

Fig. 7A to 7F show the comparison of sequence between genomic DNA sequence of SH-EPO and HE-EPO cloned by the present invention and genomic DNA sequence of the reported AM-EPO and GI-EPO. When genomic DNA sequence of AM-EPO was compared with other sequence, the different bases were marked with box.

Fig. 8 shows the comparison of amino acid sequence between SH-EPO and HE-EPO cloned by the present invention and the reported AM-EPO and GI-EPO. The different bases were marked with box.

Fig. 9 shows the comparison of EPO concentration produced from concentration in avian cell measured by ELISA and by *in vitro* bioassay.

The abbreviation of the amino acids in Fig. 5 to Fig. 8 is as follows:

A: alanine	R: arginine	N: asparagines	D: aspartic acid
C: cysteine	Q: glutamine	E: glutamic acid	H: histidine
I: isoleucine	L: leucine	K: lysine	M: methionine
F: phenylalanine	P: proline	S: serine	T: threonine
W: tryptophan	Y: tyrosine	V: valine	

3. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[Field of the Invention]

The present invention relates to novel expression systems that can produce various heterologous proteins including human erythropoietin (hereafter "EPO") and method of producing heterologous protein using that, and more specifically to the production of erythropoietin and various heterologous proteins by transfecting DNA encoding the proteins, such as the genomic DNA encoding EPO into avian cells.

[Description of the Related Arts]

Many recombinant proteins used in medicine are relatively small and simple in their structure, and biologically functional proteins can be produced in prokaryote such as *E. coli*. However, some human proteins of medical interest, such as TPA (tissue plasminogen activator), Factor VIII, EPO, etc. are more complicated because biological function requires post-translational modification. For example, EPO is extensively glycosylated with the carbohydrate portion accounting for 40 % of the molecular mass. It has been shown that the carbohydrate portion of EPO is important for biological function. Accordingly, EPO produced in *E. coli*, yeast or insect is inactive or very weakly active *in vivo*, while EPO produced in COS or CHO cells was found to be fully active. Accordingly, those kinds of heterologous proteins including EPO have been produced only in

mammalian cells.

In the meantime, the avian system has been used for the study of gene expression for a long time. One of the first viruses to be linked to tumors was the Rous sarcoma virus of chicken and this virus was instrumental in demonstrating that the retroviral oncogene can originate from a cellular gene, leading to the concept of the protooncogen.

Studies of gene expression have also been done on culture of virus in avian or avian embryo cell, but for expression of heterologous genes of mammalian cells avian embryo cells have not been used.

[SUBJECT MATTER OF THE INVENTION]

The present invention is a research for the high level expression of eukaryotic heterologous proteins. It is an object of the present invention to provide a novel heterologous gene expression system which can produce proteins of higher eukaryotic cells; It is another object to provide the method of efficiently producing higher eukaryotic proteins, such as EPO, etc., which has been known to be active only when they are produced in a mammalian cell; and It is a further object of the invention to provide the method of producing, especially, EPO among the eukaryotic proteins described above.

[THE MEANS FOR SOLVING SUBJECT MATTER OF THE INVENTION]

To accomplish the objects of the present invention, the present invention provides a heterologous gene expression system comprising a DNA encoding a heterologous protein, a vector for receiving the DNA; and an avian cell for harboring the vector, wherein the DNA prefer a genomic DNA of EPO more preferably that of EPO cloned by special technique heterologous gene, the avian cell refer duck embryo cell (hereinafter "DE")

The present invention provides a system of producing a EPO comprising a DNA encoding a EPO protein, a vector for receiving the DNA; and an duck embryo cell for harboring the vector.

The present invention provides a method of producing a EPO comprising inserting a DNA encoding a EPO protein into a vector; transfecting the vector in an duck embryo cell; and culturing the transfected duck embryo cell in media.

In expression system and production method of EPO of the present invention, the DNA is preferable a genomic DNA encoding EPO,

and more preferably is DNA shown in Fig.5 or Fig.6.

In expression system and production method of EPO of the present invention, the vector is preferable a vector harboring the HCMV MIEP as promoter.

The present invention provides an expression system of a heterologous gene comprising DNA encoding a heterologous gene; a vector for receiving the DNA; and an avian cell for harboring the vector.

The present invention provides a method of producing a heterologous protein comprising culturing the expression system of a heterologous gene of the present invention; and expressing the heterologous gene.

The present invention provides an avian cell for expressing a heterologous gene as host cell.

The present invention provides a method of producing a heterologous protein comprising culturing an avian cell having a vector inserted with heterologous genes encoding a heterologous proteins of a high eukaryote cell in media; and purifying a heterologous proteins from

the cell and media.

In the expression system of a heterologous gene and production system of the present invention, the heterologous gene selected from the group consisting of EPO, TPA and Factor VIII.

In addition, in the expression system of a heterologous gene and production system of the present invention, the vector contains promotor selected from the group consisting of highly active promoters of high eukaryote cell such HCMV MIEP, SV40 early promoter, RSV LTR, etc.

In the expression system of a heterologous gene and production system of the present invention, the avian cell preferably is selected from the group consisting of DE, chicken embryo fibroblast cell (hereinafter "CEF")

In the expression system of a heterologous gene and production system of the present invention, the heterologous gene is selected from the group consisting of genomic DNA, and cDNA encoding heterologous proteins.

[EXAMPLE]

Hereinafter, preferable examples are presented for the sake of understanding. These examples, however, are provided to facilitate the understanding and the present invention is not limited to the following example.

The inventors have explored the possibility of using avian cells as a host cell for heterologous gene expression. We have chosen to use two avian embryonic cells, chicken and duck. We chose to use the chicken and duck embryo cells for the following the reasons. First, these embryonic cells can easily be prepared from eggs, and they divide rapidly. Second, chicken and duck cells can be grown at large scale with relatively low cost. Third, some avian cells, such as those from chicken embryos have already been used for medical products. For example, influenza virus has been cultured in chicken eggs for the production. Finally, the culture conditions, including media and temperature, required by avian embryo cells are virtually identical to those of mammalian cells so that the developed culture method of mammalian cells can be used and can be optimized culture condition.

I. Cells and Plasmids

1. Cells

The following Table I shows cells used in the experiment.

(Table 1)

HeLa human cervical Cal carcinoma cells	ATCC CCL2
Vero African green monkey kidney cells	ATCC CCL8
COS-7 African green monkey kidney cells transformed by wild-type T antigen of SV40	ATCC CRL1651
CHO-K1 Chinese hamster ovary cell	ATCC CRL61
NIH3T3 contactinhibited Swiss mouse embryo cells	ATCC CRL1651
Ad-5 transformed human embryonic kidney cells 293	ATCC CRL1591
SL-29 chicken embryo fibroblast cells	ATCC CRL1590
Duck embryo	ATCC CRL141 or prepared by the inventors

All these cells were grown in Dulbeccols modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Duck embryo was either obtained from ATCC CCL 141 or prepared in laboratory. by of The embryo cells were isolated from the 10- to 13- day old decapitated duck embryos and were treated with trypsin. These avian cells were grown in minimum essential medium (Eagle) supplemented with non-essential amino acids and Earle's balanced salt solution containing 10 % FBS. These cells could be maintained for approximately another 30 passages. Each medium used in this study was supplemented with 120 ug/ml penicillin G (Sigma P-3032: 1690 units/mg) and 200 ug/ml streptomycin (Sigma S-9137: 750 units/mg).

2. Plasmids

To evaluate the efficiency of heterologous protein production in avian cells, pRc/RSV-CAT and pRc/CMV-CAT were constructed by inserting a HindIII CAT cassette (Pharmacia, Piscataway, NJ) into the HindIII sites of pRc/RSV and pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, California, USA), respectively. For PSV-CAT, the plasmid p918 was used, which has been already described by the inventors. For EPO expression vectors, two vectors were used. pCMV-gEPO was constructed by cloning the HindIII fragments of the EPO genomic sequence into the HindIII site of pRc/CMV. pSV-gEPO was derived by replacing the CAT sequence of pSV918 with the genomic EPO sequence. To measure the transfection efficiency, the plasmid pCMV-lacZ was constructed by inserting bacterial lacZ fragment into the HindIII site of pRc/CMV.

II . DNA Transfection of avian cell

The inventors tested whether avian embryo cells could be used for high levels of heterologous gene expression instead of mammalian cells. Although avian embryo cells have been used to culture viruses, there was no report that heterologous proteins of higher eukaryotic cells were

expressed in these cells. To carry out the study, it is necessary to develop the method of efficient transfection to avian cells. That is, to express heterologous genes in avian cells, it is required to develop the transfection technique of DNA to target cells. At present, we could not find any reports on DNA transfection of avian embryo cells. Accordingly, the inventors have developed the technique that CEF and DE cells can readily be transfected with DNA.

Among the techniques available, we have chosen a method using calcium phosphate co-precipitation, because this works well for various adherent cells and can also be used for establishing permanent lines. We have tested many different conditions and found that the following procedure was optimum.

When cultures were 50-70% confluent in a 100 mm culture dish, total of 10 ug DNA in HBS buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mM dextrose, 25 mM HEPES) was incubated with the cells for 30 min at room temperature. 10 ml of regular media containing FBS was added and incubated for 20 hrs at 37 °C. CHO-K1 was incubated for 8 hours. Cells were then treated with 10 ml of 100 uM chloroquine, and incubated for another 3 hours at 37 °C. After

replacement with 10 ml of fresh media, the cells were grown for 1 to 2 days. Culture supernatants were collected and centrifuged at 1000 rpm for 10 min to remove cells and debris. Control experiment was performed with supernatants of un-transfected cell culture and transfected cell with a plasmid not contained EPO sequence. To measure transfection efficiency, cells were transfected with pCMV-lacZ, rinsed once with PBS, 3 days after transfection, fixed with 0.5 % glutaraldehyde (in PBS) for 10 min, and washed twice for 2-10 min each with 4 ml PBS containing 1 mM MgCl_2 . For X-gal staining, the staining solution [PBS containing 4 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 4 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 mM MgCl_2 , and 400 $\mu\text{g/ml}$ X-gal (in dimethylformamide)] was added to fixed cells, and incubated at 37 °C for 4 hours overnight. When the reaction was completed, cells were washed once with PBS and stained cells were kept in PBS.

CAT assay was carried out as follows.

Two to three days after transfection, cells were harvested, washed once with PBS, and resuspended in 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5). Total proteins were prepared by 4 cycles of freeze/thawing followed by heating at 65 °C for 7 min. Equivalent amounts of protein were assayed for CAT activity at 37 °C for 30 min. The amount of protein and the reaction time

varied, depending on the experiments. For example, the CAT activity of cell extracts prepared from DE cells was so high that only 10 ug protein and 20 to 30 min reaction time had to be used, and under this condition, levels of CAT activity in other mammalian cells were very low or undetectable. When CAT activity became detectable in other cells, virtually all ^{14}C -chloramphenicol was converted. The percent conversion of ^{14}C -chloramphenicol to its acetylated forms was determined by cutting out regions containing unreacted and acetylated forms and quantifying the amount of radioactivity in each by liquid scintillation counting.

We initially chose to use a promoter from the major immediate-early region of HCMV, because this has been shown to drive a high level gene expression in many different cell types. In the plasmid PCMV-CAT, the bacterial CAT gene is placed under the control of the HCMV MIEP. As a negative control, the plasmid pRc/CMV containing the promoter but no CAT sequence was used. These plasmids were transfected into DE and CEF cells and CAT activity was measured to estimate the efficiency of transfection and gene expression. One representative result from several independent transfections is shown in Fig. 1. Transfection of a control plasmid resulted in undetectable levels of CAT activity in both cells of lane 1 and lane 3. However, transfection with PCMV-CAT resulted in readily detectable levels of CAT activity in both cells. In more than five

independent transfection assays, the level of CAT activity was always higher in DE cells than in CPF cells. The magnitude of difference in the level of CAT activity between the two cells ranged from 10- to 50-fold, depending on the experiment.

This result indicated that avian cells were readily transfected with DNA and the heterologous genes could be efficiently expressed.

III . Comparison of Levels of Gene Expression between Avian and Mammalian Cells, and between Different Promoters

We have compared the levels of gene expression between avian and mammalian cells, using three different promoters;

- (1) the SV40 early promoter;
- (2) the HCMV MIEP (Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter); and
- (3) the RSV LTR (Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat).

These promoters are known to be powerful in mammalian cells, and have often been used for high level heterologous gene expression.

These promoter-CAT fusion constructs were transfected into four

different cell lines, DE, CEF, CHO-KL, and HeLa, and CAT activity measured to compare the efficiency of gene expression between promoters and between cell types. To make this comparison semi-quantitative, all transfections and CAT assays were performed at the same time and using identical conditions. One representative result of such experiments is shown in Fig. 2. Here, 10 ug of cell extracts were incubated for 30 min at 37 °C in the CAT reaction. Under these particular conditions, the levels of CAT expression driven from the three promoters were very low in CHO and HeLa cells (lane 7 to lane 12 in Fig. 2). Only after larger amounts of proteins, 80 – 100 ug, were used for extended reaction time for 90 min was CAT activity detected. On contrast, CAT activity was readily detectable in the avian cells (lane 1, 2, 3, 5, and 6 in Fig. 2), except for the SV40 promoter in CEF cells. It indicated that the expression in avian cells are more effective than that in mammalian cells.

The most dramatic finding was that the HCMV MIEP was extremely powerful in DE cells (lane 2 in Fig. 2). In Fig. 2, the conditions used for the CAT reaction were chosen to generate the reasonable levels of CAT activity in other samples. When the CAT reaction was performed under limiting conditions for the protein sample used in lane 2 of Fig. 2 (i.e., when the CAT conversion was below 50 %), the levels of CAT activity of all the other samples were virtually undetectable. Therefore, the magnitude of

difference in CAT activity between the protein sample from DE cells transfected with HCMV-CAT and those from the other transfections is at least two orders of magnitude. These results suggested that heterologous genes could be expressed very efficiently under the control of the HCMV MIEP in DE cells.

IV. Analysis for high level expression in DE cells

It was confirmed that DE cells expressed very efficiently the heterologous protein, CAT through the above experiment (III. comparison of levels of gene expression between avian and mammalian cells, and between different promoters). For analyzing this reason, the below experiments was performed.

It is possible that the high levels of CAT expression seen in DE cells could be due to efficient transfection of the cell population, rather than an ability of these cells to support strong gene expression. It is possible that the number of transfected cells is so many that expression yields is high. To distinguish these possibilities, we transfected pCMV-lacZ into DE and various animal cells. After transfection, cells were stained with X-gal, and the number of blue cells was counted to estimate the transfection

efficiency. As shown in Fig. 3, the number of stained cell was always comparable between DE and other animal cells.

Therefore, it is suggested that the high levels of protein expression in avian cells were due to an ability of avian cells including DE cell to support strong gene expression more than that of animal cells.

V. Cloning of human erythropoietin

To test whether DE cells could indeed be used for the expression of medically important human Proteins, we have isolated the genomic DNA encoding the human EPO gene. We chose to use EPO as a model because it is a secreted protein, so we could test whether DE cells properly process secreted proteins. We also used a genomic clone of EPO instead of the cDNA, to assess whether human genes are properly spliced to produce functional mRNA in DE cells.

DNAs for cloning of EPO were prepared with blood cells collected from four people. Human peripheral blood lymphocytes were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation of heparin-treated blood cells. Total DNA was prepared and used for polymerase chain reaction using specific oligonucleotide primers (Fig. 4). The region around the start codon was highly GC rich, so the EPO sequence was cloned by two steps

of PCR using two different pairs of primers.

To obtain the genomic DNA for EPO, total DNA was prepared by lysing human peripheral blood lymphocytes using TES (10 mM Tris-HCl pH 7.8; 1 mM EDTA; 0.7 % SDS) followed by the treatment with 400 ug/ml proteinase K at 50 °C for 1 hour, phenol:chloroform extraction, and ethanol precipitation. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using 0.1 ug of total genomic DNA and oligonucleotide primers specific to the EPO gene.

Primer #25 (sense, 5' to 3'): GAAGCTGATAAGCTGATAACC

Primer #33 (antisense, 5' to 3'): TGTGACATCCTTAGATCTCA

The samples were amplified through 30 cycles that included the following parameters: denaturation at 92 °C for 1 min, primer annealing at 55 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 1 min. The DNA fragment amplified from this reaction did not contain the first 13 nucleotides in the N-terminal region, so a second PCR was performed using the following primers (these primers are as shown in Fig. 4)

Primer #12(sense, 5' to 3'):

CAAGCTTCGGAGATGGGGGTGCACAATGTCCTGCCTGGCTGT
GGC

Primer #9(antisense, 5' to 3'):

CAAGCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGC

The amplified DNA from the second PCR was cloned into the is pCRII (Invitrogen), from which the HindIII fragment containing the genomic sequence of EPO was inserted into various expression vectors as described above. In this experiment, the amplified DNA was placed under the control of the HCMV MIEP or SV40 early promoter, generating pCMV-gEPO and pSV-gEPO respectively.

VI. Analysis of Nucleotide Sequences of Cloned EPO Genomes

Genomic structure of EPO cloned by the above method is different from the natural EPO genome in vivo. That is, wild type EPO genomic DNA has five coding regions and four introns between them. However, in the DNA cloned by the above method (V. Cloning of human erythropoietin), the first coding region was fused to the second coding region to form one coding region so that it has four coding regions and three introns.

DNA sequences of two EPO genes cloned in the above method

are shown in Fig. 5 and Fig. 6 (Hereinafter sequences shown in Fig. 5A to 5C is "HE-EPO" and that in Fig 6A to 6C is "SH-EPO"). The nucleotide sequences of the cloned EPO are significantly different from those of the prior two EPOs ("AM-EPO" and "GI-EPO") (Fig. 7 and Fig. 8). Three amino acid of the cloned EPO differed the known EPO. When compared with AM-EPO or GI-EPO, HE-EPO had different amino acid at C-terminal and SH-EPO three different amino acid over the whole polypeptide. For example, while AM-EPO and GI-EPO had serine, alanine, and valine at positions 36, 100 and 170 respectively. SH-EPO had arginine, serine, and tyrosine. Further, while AM-EPO and GI-EPO had valine, lysine, and alanine at positions 170, 177, and 191, HE-EPO had tyrosine, glutamine, and glycine.

VII. Expression of EPO in DE Cells

EPO expression vectors were transfected into various cells including DE, CEF, CHO, HeLa, VERO, and 293T. We have included VERO cells because they are often used for heterologous gene expression, and 293T cells which drive very high levels of gene expression, presumably due to both the high frequency of DNA transfection and the presence of potent viral transactivators such as E1A, E1B, and large T antigen. Two to three days after transfection, levels of EPO in the culture

supernatants were measured by the enzyme linked immunoadsorbent assay(R & D systems Inc., catalog number DEP00, Minnesota, U.S.A.). The result of this analysis is summarized in Table 2.

(Table 2)

Cell	HCMV MIEP	SV40 early promoter	HCMV/SV40
293T	314	17.5	18
CHO	139.4	10.4	13.5
VERO	250	10.7	23.5
NIH3T3	89	79.4	1.1
DE	4335	13.8	314.8

When the SV40 early promoter was used, there was little difference in the levels of EPO between cell types. However, when the HCMV MIEP was used, DE cells produced much higher levels of EPO than any other cell lines tested. The HCMV MIEP was much more active than the SV40 early promoter in almost all the cells tested. This difference was especially pronounced in DE cells, where the former produced 315 times more EPO than the latter. Among the various cell types, DE cells always produced the highest level of EPO. CHO cells are the source of cell lines producing EPO that is currently used for human application. In this transient system, however, the level of EPO in CHO cells was at least 30-fold lower than in DE cells. In conclusion, human EPO could efficiently be produced and secreted in DE cells and that the HCMV MIEP is the promoter of choice for driving high level heterologous gene expression in DE cells.

In summary, we found that DE cells could produce very high levels of bacterial and human proteins. All promoters tested drove higher levels of gene expression in DE cells than any other cell lines used in this study. In particular, the HCMV MIEP was extremely powerful in DE cells. The high level of heterologous gene expression observed was not due to a higher number of transfected cells. It appears that DE cells properly process splicing and secretion because transfection of DE cells with an expression vector containing the EPO genomic DNA sequence produced a large quantity of EPO in the culture supernatant.

VIII Biological Activity of EPO Produced in Avian Cells

To test whether EPO expressed in avian cells was biologically active, we carried out an *in vitro* bioassay using spleen cells.

Spleen cells were taken from C57BL/6 X C3H FI hybrid mice on day 3 after the second of two daily injections of 60 mg/Kg/body/day phenylhydrazine (about 1.2 mg/0.1 ml) and homogenized with PBS in 100 mesh. Spleen cell suspensions were prepared with Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS) and centrifuged in 2000 rpm, for 20 min. Cells were collected at boundary layer, washed three times with PBS and centrifuged in 1500 rpm. The spleen cells final concentration 4×10^6 cells

/ml were then incubated in 24 well culture plates with various standard doses of EPO control or unknown samples for 22 hr. then pulsed with 4 uci/well tritiated thymidine was added and reacted for 2-3 hr. The cells were harvested, washed two times with PBS, fixed with methanol and lysed by 0.3 N NaOH and 0.1% SDS. The tritium amount of cell was calculated by LSC solution.

Fig. 9 shows the comparison of EPO concentration produced from DE cell measured by ELISA and by *in vitro* bioassay using kit that is currently used for determining EPO concentration in human serum. The bioassay determines biological activity using a control EPO that has been produced from mammalian cells. The ratio between the EPO values determined by these two methods was 1 ± 0.15 , and the levels of EPO measured by ELISA were very comparable to those obtained by the bioassay. This result suggested that EPO produced from these avian cells had a similar biological activity to commercially available EPO

EPO produced from avian embryo cells had a similar biological activity to commercially available EPO produced from mammalian cell.

[EFFECT OF THE INVENTION]

The avian cell, such as duck embryo cell line can be produce a heterologous protein including a heterologous protein of high eukaryote cell, such as heterologous gene for EPO so that heterologous proteins were efficiently overexpressed by using the avian cells.

4. WHAT IS CLAIMED IS:

1. An EPO production system comprising:
a DNA encoding EPO;
a vector for receiving the DNA; and
an duck embryo cell for harboing the vector.
2. The EPO production system of claim 1, wherein the DNA is
a genomic DNA encoding EPO.
3. The EPO production system of claim 1, wherein the DNA
encoding EPO is selected from the group consisting of genes described in
Fig. 5 or Fig. 6.
4. The production system of claim 1, wherein the vector
contains a promoter selected from the group consisting of SV early
promoter, RSV LTR and HCMV MIEP.
5. A method of producing EPO comprising the steps of.
inserting a DNA encoding an EPO into a vector;
transfecting the vector into an duck embryo cell; and
culturing the transfected duck embryo call in media.

6. The method of claim 5, wherein the DNA encoding EPO is a genomic DNA.

7. The method of claim 5, wherein the DNA encoding the EPO is selected from the group consisting of DNA sequences described in Fig. 5 or Fig. 6.

8. The method of claim 5, wherein the vector contains a promoter selected from the group consisting of SV40 early promoter, RSV LTR and HCMV MIEP.

9. A heterologous gene expression system comprising:
a DNA encoding a heterologous gene;
a vector for receiving the DNA; and
an avian cell for harboring the vector.

10. The expression system of claim 9, wherein the heterologous gene is selected from the group consisting of TPA, Factor VIII and EPO.

11. The expression system of claim 9, wherein the vector contains a promoter selected from the group consisting of SV early

promoter, HCMV MIEP and RSV LTR.

12. The expression system of claim 1, wherein the avian cell is selected from the group consisting of DE and CEF.

13. An avian cell as a host for expressing a gene encoding heterologous protein derived from high eukaryote cell.

14. A method of producing a heterologous protein comprising the steps of,
culturing the avian cell containing the expression system of claim 9 in media; and
expressing the heterologous protein.

15. The method of claim 14, wherein the heterologous protein is selected from the group consisting of TPA, Factor VIII and EPO.

16. The method of claim 14, wherein the vector contains a promoter selected from the group consisting of SV early promoter, HCMV MIEP and RSV LTR.

17. The method of claim 14, wherein the avian cell is selected

from the group consisting of DE and CEF.

18. The method of claim 14, wherein the DNA encoding the heterologous protein is DNA or CDNA.

19. A method of producing a heterologous protein comprising the steps of,

culturing the avian cell containing a heterologous gene harboring vector in media, wherein the heterologous gene encode heterologous protein derived from the high eukaryotic cell; and

purifying the heterologous protein from the cell and media.

20. 26. An EPO genomic sequence selected from the group consisting of genes described in Fig. 5 or Fig. 6.

ABSTRACT

Heterologous protein expression system including a heterologous gene DNA such as EPO genomic DNA, a vector receiving the DNA and an avian cell, such as duck embryo cell, expressing the gene in the vector can be used to efficiently produce heterologous proteins such as EPO and to obtain a lot of the heterologous proteins.